Lane Medical Library

Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik München
Direktor: Geh. Rat Prof. Dr. E. v. Romberg

Über die klinische Brauchbarkeit der quantitativen Cholinbestimmung am überlebenden Dünndarm

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Bayrischen Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ernst Roeckl
prakt. Arzt

Universitätsverlag von Robert Noske in Borna-Leipzig
1927

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Bayrischen Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Referent: Prof. Dr. Ph. Klee
Korreferent: Geheimrat Prof. Dr. E. v. Romberg

Zu Untersuchungen von Körperflüssigkeiten auf ihren Gehalt an Cholin bediente man sich anfangs einer von Stanek, Schmitt, Schulze, Kiesel, Kutscher, Gulewitsch, Gieße u. a. ausgearbeiteten, mühevollen und quantitativ ungenauen chemischen Methode der Cholinfällung durch Kaliumtrijodid, Cadmium- und Platinchlorid oder Wolframsäure.

Erst viel später entwickelte sich im Anschluß an die Arbeiten von Reid Hunt und von Führer am Froschherzen, sowie von Le Heux und von Guggenheim und Löffler am überlebenden Darm die biologische Methode.

Durch die wichtige Entdeckung von Reid Hunt und de Taveau, die die vieltausendfache pharmakologische Wirkungssteigerung des Cholins durch Überführung des Cholins in seinen Essigsäureester, das Acetylcholin nachwiesen, wurde es möglich, auch minimale Cholinmengen in Körperflüssigkeiten zu bestimmen.

Bei dieser biologischen Methode handelt es sich im Prinzip darum, daß an dem, in einer Nährlösung suspendierten, mit einem Schreibhebel verbundenen, überlebenden Organ durch Zugabe einer Cholin- oder Acetylcholinlösung bekannter Konzentration diejenige Cholinmenge zu bestimmen ist, die entweder eben noch im Sinne einer Grenzdosis eine Reaktion des verwendeten Organs hervorzurufen vermag, beim Darm also eine Zunahme der Pendelbewegungen und Tonussteigerung, beim Froschherzen eine Verkleinerung der Amplitude, beim Uterus eine Tonuszunahme, oder imstande ist, einen diastolischen Herzstillstand hervorzurufen. Gibt man dann eine Quantität x der zu untersuchenden, acetylierten Flüssigkeit zu und erhält die gleiche Reaktion des verwendeten Organs, so ist anzunehmen, daß in x eben jene vorher bestimmte Grenzdosis Cholin enthalten ist. Die Bestimmung der „Wirkungsbreite“ läßt eine Einwirkung andersartiger Stoffe ausschließen. Der Gesamtgehalt des verwendeten Ausgangsstoffes an Cholin ist nun leicht rechnerisch festzustellen.

Ein Beispiel möge dies erläutern: Bei Anwendung der Guggenheimschen Methode wurde festgestellt, daß ein Zusatz von 1,0 ccm einer Acetylcholinlösung 1 : 1 Million zu 100 ccm Suspensionsflüssigkeit eben noch den suspendierten Dünndarm zu einer Tonussteigerung oder Zunahme der Pendel-

bewegungen veranlaßt. Die Grenzdosis für dieses Darmstück beträgt also: Acetylcholin 0,000 001 g.

Nach einem Wechsel der Nährlösung erzeugen 4 ccm einer acetylierten 50fach verdünnten Blutserumlösung die gleiche Reaktion des Darmstückes. Nun ist die Annahme berechtigt, daß in diesen 4 ccm 0,000 001 g Acetylcholin enthalten ist, in 50 ccm Blutserumlösung, die einer Blutserummenge von ursprünglich 1 ccm entsprechen, also 0,0000125 g, oder 12,5 mg/L.

Die mit Hilfe der oben erwähnten Methoden ermittelten Cholinwerte bewegten sich jedoch in derartig weiten Grenzen, daß die Vermutung nahe lag, es könnten diese großen Schwankungen z. T. durch Titrationsungenauigkeiten bedingt sein. Wenn dem Cholin wirklich eine hormonale Bedeutung zukommt, so wären diese Wertunterschiede zum mindesten recht auffallend.

So fanden z. B. Guggenheim und Löffler im menschlichen Blutserum 2—20 mg/L, ohne jedoch Schwankungen nach pathologischen Gesichtspunkten feststellen zu können.

Reid Hunt, später Heesch erzielten mit der Froschherzmethode Blutserawerte von 0,25—1,0 mg%.

Sieburg und Patzschke fanden mit der Darmmethode von Guggenheim und Löffler bei nichtmenstruierenden Frauen 0,5 bis 0,8 mg/L im Serum, bei menstruierenden im Durchschnitt 6—8 mal soviel.

Abderhalden und Paffrath kamen zu der Ansicht, daß „wir leider über keine Methoden verfügen, um derartig geringe Cholinmengen, wie sie im Blute zu erwarten sind, einwandfrei quantitativ bestimmen zu können. Die Fehlergrenzen der biologischen Wertbestimmung des Cholins sind für diesen Zweck zu groß". Und an anderer Stelle: „Die Fehlergrenzen der biologischen Cholinbestimmung sind leider recht beträchtliche. Bei der Verarbeitung und Acetylierung kann kaum Cholin verloren gehen. Aber die Reizschwelle ist nie absolut konstant." Verfasser rechnen mit einem Fehlerquotienten von $\pm$ 26%.

Ich habe auf Veranlassung von Professor Ph. Klee versucht, die Darmmethode der Cholinbestimmung auf ihre Genauigkeit und Brauchbarkeit für klinische Zwecke zu untersuchen.

Chemische Vorbereitung.

Es wurden in jedem Fall ca. 20 ccm Blut aus einer Mediana möglichst morgens zwischen 10 und 11 Uhr entnommen und entweder sofort verarbeitet oder, nicht länger als 12 Stunden, im Eisschrank aufbewahrt. Das Ganze wurde 15 Minuten lang in der elektrischen Zentrifuge scharf zentrifugiert und von dem gewonnenen Serum Portionen von je 2 ccm abpipettiert. Nur klares, gelbliches Serum ohne Blutfarbstoffbeimengungen wurde verwendet.

Anfangs stellten wir von jedem Serum Kontrollösungen her, es ergaben sich jedoch nur derartig geringe Differenzen, daß wir späterhin davon absehen zu können glaubten.

Zu den 2 ccm Serum wurden tropfenweise, um ein klumpiges Ausfallen des Serumeiweißes zu verhindern, ca. 4 ccm Acetonum puriss. Kahlbaum*) zugegeben und das ausgefällte Eiweiß im Glasfilter mittels Saugpumpe abfiltriert. Aus der erhaltenen, leicht gelblich gefärbten, klaren Flüssigkeit wurde das überschüssige Aceton auf dem Wasserbade im Saugkölbchen abgedampft. Das enteiweißte Serum wurde dann in ca. 25 g ausgeglühtem Quarzsand aufgenommen und 24 Stunden bei 120° im Trockenschrank getrocknet. Den die Trockensubstanz von 2 ccm Serum enthaltenden Quarzsand füllten wir in starkwandige Glaskölbchen aus Jenaer Glas, gaben mittels Kapillartrichter 2 ccm Acetylchlorid Kahlbaum dazu, verschlossen die Kölbchen mit Gummistöpseln und verknoteten diese mit starken Seidenfäden. Dadurch vermieden wir das bei der von Guggenheim angegebenen Methode häufige Platzen der Röhrchen. Die Kölbchen erhitzten wir 4 Stunden bei 40—60° im Trockenschrank. Nach erfolgter Abkühlung und vorsichtiger Öffnung vertrieben wir das überschüssige Acetylchlorid und die gebildete HCl über schwacher Gasflamme unter dem Abzug bis zur völligen Geruchlosigkeit des Quarzsandes. Mit 100 ccm Froschringer- oder Tyrodelösung wurde hierauf der Quarzsand mehrmals ausgewaschen und schließlich mit der Saugpumpe durch Glasfilter gefiltert. Auf diese Weise wurden die in ihm enthaltenen Substanzen in den verwendeten Lösungen aufgenommen. Mit Phenolphthalein und einigen Tropfen Sodalösung alkalisierten wir bis zu schwacher Rötung.

In derartig behandelten 100 ccm Froschringer- oder Tyrodelösung befand sich also das acetylierte Cholin von 2 ccm Blutserum. Wir stellten zur gleichen Zeit immer zehn bis zwanzig verschiedene Serumlösungen her und schlossen der chemischen Vorbereitung die biologische Titration möglichst unmittelbar an, um nicht durch eventuell eintretende Zersetzungen den Fehlerquotienten zu erhöhen.

Biologische Titration.

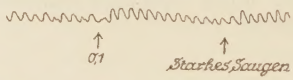
I. Die Versuchsanordnung richtete sich im wesentlichen nach den Angaben von Guggenheim und Löffler: Ein frisch reseziertes Dünndarmstück wurde mit seinem einen Ende am Boden eines mit Tyrode- oder Katzendarmringerlösung gefüllten Glases bekannter Kapazität befestigt, das andere mit einem dünnen Faden abgebunden und dieser an einem gut ausbalancierten Schreibhebel befestigt, der eventuelle Darmbewegungen auf die berußte Kurve eines Kymographions übertrug. Durch Aufstellung des Glases mit der Nährflüssigkeit in einem Wasserbade und Erwärmung desselben durch einen Quecksilberthermoregulator wurde für gleichmäßige Temperaturen gesorgt,

*) Nach Beendigung dieser Arbeit hat es sich herausgestellt, daß die Fällung des Serumeiweißes mit Trichloressigsäure vorzuziehen ist.

da nach den Untersuchungen von Magnus Temperaturschwankungen der Suspensionsflüssigkeit die Darmarbeit in weitgehendem Maße beeinträchtigen.

Durch eine Sauerstoffbombe, oder — besser und einfacher — durch Druckflaschen, wurde in möglichst kleinen und gleichmäßigen Perlen Luft durch die Nährflüssigkeit geblasen. Dadurch erfolgte zugleich eine ständige gute Durchmischung. Eine unvorsichtige Verstärkung oder Abschwächung des Luftstromes kann störenden Einfluß auf die Art der Arbeit und die Reaktionsfähigkeit des Darmes ausüben. Es ist darauf zu achten, daß nicht durch die Druckerhöhung, die durch Zusetzen selbst geringer Flüssigkeitsquanta zu der Nährlösung im Suspensionsglase entsteht, die Luftzufuhr vermindert wird oder ganz aufhört. Der Darm antwortet sehr rasch darauf, und diese Reaktionen wurden anfänglich häufig — post hoc, ergo propter hoc — irrtümlicherweise als Wirkung erfolgter Zusätze gedeutet. Die Zugabe von Flüssigkeiten zur Nährlösung selbst muß langsam und gleichmäßig erfolgen. Wie die Kurve 2 zeigt, wirkt ein Ausblasen der feinen cmm-Pipette, die wir zum Zusetzen verwendeten, auf einen empfindlichen Darm schon als Reiz, den er prompt mit einer Tonussteigerung beantwortet:

Kurve 2.



Scheinbare Cholinwirkung. 0,1 Serum X bei a, Ausblasen der Pipette bei b: gleiche Reaktion.

Ein leichter, durch ein Laufgewicht ausbalancierbarer Schreibhebel ist ebenfalls Grundbedingung einer gleichmäßigen Darmarbeit. Durch Stellschrauben muß sein Druck auf die berußte Kurve ständig reguliert werden, da sonst der auf den Darm übertragene Widerstand, den ein stark anliegender Hebel an der Kurve findet, auf den Darm übertragen als Dehnungsreiz wirkt.

Ferner hat sich mir nur der Darm nüchterner Tiere bewährt. Als Versuchstiere zog ich Katzen den Kaninchen und Meerschweinchen vor. Der muskelstarke, derbwandige Darm der carnivoren Katze ist den mechanischen Insulten, die sich wenigstens bei längerer Benützung eines Stückes nicht vermeiden lassen und als welcher m. E. auch jeder Wasserwechsel zu gelten

hat, viel resistenter als der zarte, dünnwandige Darm von Herbivoren. Auch eine Einlagerung auf Eis scheint er noch besser zu vertragen

Unter Berücksichtigung alles dessen ist es relativ einfach, ein gut arbeitendes Darmstück in lebhafter Tätigkeit zu erhalten.

II. Hatte ich einen Darmabschnitt eingespannt und ersah aus der Gleichmäßigkeit der registrierten Kontraktionen, daß das Einspannen ohne gröbere mechanische Schädigungen gelungen war, so begann ich mit einem Zusatz von 0,75 ccm einer frisch bereiteten Acetylcholinlösung $1 : 10^6$ zu den 75 ccm der Nährlösung.

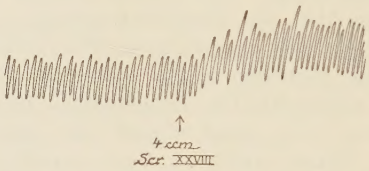
Der Darm antwortete fast immer prompt mit einer Tonussteigerung und Zunahme der Pendelbeweguugen. Hierauf ging ich mit der Menge der jeweilig zugesetzten Acetylcholinlösung so lange herunter, bis keine Reaktion mehr erfolgte. Diese letztgegebene Dosis wurde als unterschwellig angenommen und die nächsthöhere noch einmal gegeben, was meist wieder eine prompte Reaktion des Darmes bewirkte. Diese ermittelte Dosis wurde als Grenzdosis angenommen und nun mit der zu untersuchenden Serumlösung — in praxi einer Acetylcholinlösung unbekannter Konzentration — in gleicher Weise verfahren. Hatte ich bei letzterer z. B. 4 ccm als eben noch wirksame Grenzdosis ermittelt, so war die in dem betreffenden Serum enthaltene Cholinmenge leicht rechnerisch zu ermitteln (s. o.). Als Testlösung stellte mir die Firma Hoffmann La Roche in Basel Acetylcholinchlorid in fester Form oder in Ampullen von 0,001 g pro ccm zur Verfügung. Ersteres ist infolge seiner starken Hygroskopie nur im Schwefelsäureexsikkator aufhebbar und die Herstellung der Testlösung deshalb schwierig. Die Ampullen haben sich sehr gut bewährt, in dieser Konzentration scheint das Acetylcholinchlorid fast unbeschränkt haltbar zu sein, während es sich in der verwendeten Konzentration von $1 : 10^6$ in einigen Tagen trotz Lichtabschluß und Aufbewahrung im Eisschrank zersetzt. Das Acetylcholin zeigte sich meist noch in einer Konzentration von 1 : 100 000 000 wirksam. Auch Guggenheim und Löffler waren zu diesem Resultat gekommen.

Es war mir anfangs darum zu tun, zu den Versuchen ein Darmstück zu bekommen, das möglichst den Verhältnissen intra vitam entsprach. Ich ging dabei von der Überlegung aus, daß die Cholinwirkung hauptsächlich von der Menge des zugegebenen Cholins abhängig sei und die Reaktion des Darmes umso deutlicher würde, je frischer und intakter er bei der Ausführung des Versuches wäre.

Ich verwandte deshalb anfangs nur frische Darmstücke zu den Versuchen, wie sie die Kurve 4 in ihrer Wirkung wiedergibt.

Die Präparation derartig arbeitender Darmstücke machte große Schwierigkeiten. Zu jeder Serumtitration brauchte ich ein neues Darmstück, da es sich ergab, daß der Darm ohne Wechsel der Nährlösung eine wiederholte Zugabe von Acetylcholinlösung oder Serumlösung selbst bei gleichen oder sogar größer werdenden Dosen mit immer schwächeren Reaktionen beantwortete, anderenteils aber ein mehrmaliger Wechsel der Nährlösung sein Verhalten in vorerst unübersehbarer Weise veränderte.

Kurve 4.



Katze.

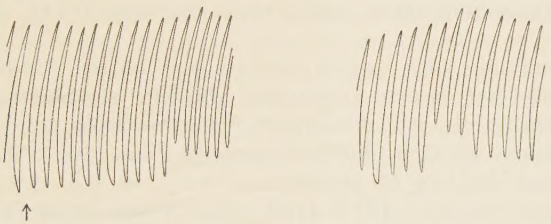
Es wurde daher aus Sparsamkeitsrücksichten notwendig, einen Modus zu finden, der es gestattete, beim selben Tier ohne besondere Darmschädigung wiederholt zu laparatomieren. Es ergab sich jedoch, daß sowohl längere Chloroform-, wie auch Äther-, Somnifen-, Urethan- oder Chloralhydrat-Narkose die Reaktionsfähigkeit des Darmes für Acetylcholin in weitgehendem Maße herabsetzten. Ich bekam meist eigenartig verzögerte, protrahierte Reaktionen und die Reizschwelle war deutlich erhöht. Die Tötung des Versuchstieres durch Nackenschlag mit nachfolgender sofortiger Laparatomie lieferte wohl ein gut und gleichmäßig arbeitendes Darmstück, machte aber die Auslösung des übrigen Dünndarmes in toto und dessen Einlagerung auf Eis oder in luftdurchperlter, körperwarmer Nährlösung nötig, da der Darm bei Belassung im toten Tier sehr bald abstarb. Die auf Eis gelagerten Darmstücke fingen zwar nach Wiedereinbringung in sauerstoffreiche, körperwarme Nährlösung rasch wieder zu arbeiten an, zeigten aber niemals die gleichmäßigen Amplituden, die ich für den Ausdruck eines ungeschädigten Darmes hielt. Die Aufbewahrung in körperwarmer, sauerstoffreicher Nährlösung hatte eine Auswaschung des Darmwandcholins zur Folge, was eine Veränderung seiner Cholinempfindlichkeit zur Folge haben mußte. Die besten Erfolge erzielte ich mit den Darmstücken, die ich decerebrierten Katzen entnahm. Bei guter künstlicher Atmung dieser Tiere und Fernhaltung äußerer Schädlichkeiten (Abkühlung, Blut-

verluste, mechanische Schädigung des Darmes bei den zahlreichen Resektionen des Darmes) arbeitete das Stunden post decerebrationem entnommene Darmstück meist ebenso kräftig und gleichmäßig wie das p. dec. resecierte. Doch gelang mir eine Decerebration nur bei Katzen, und außerdem war die Verwendbarkeit dieser Darmstücke doch auf die Zeit beschränkt, in der die Tiere am Leben zu erhalten waren, also höchstens 36 Stunden.

Ein Hauptgrund aber ließ mich an der klinischen Brauchbarkeit der Guggenheimschen Methode zweifeln: ein lebensfrischer Darm pflegt derartig unübersehbare periodische Schwankungen zu machen, daß eine genaue Unterscheidung: hier Reaktion — hier periodische Schwankung — hier Reaktion plus periodische Schwankung nur schwer möglich ist.

Die Kurven 5 und 6 zeigen ein Beispiel. In Kurve 5 erfolgt auf eine Zugabe von Acetylcholin eine prompte Reaktion, während Kurve 6 zeigt, daß die dem Typus und der Dauer nach völlig gleiche „Reaktion" auch ohne jeden Zusatz erfolgt, also einfach eine periodische Schwankung ist.

Kurve 5 und 6.



Kaninchendünndarm. 1. Laparatomie bei dem durch Nackenschlag getöteten Tier.

Diese Schwierigkeiten ließen mich an der klinischen Brauchbarkeit dieser Methode zweifeln, zumal mir Beobachtungen während des Arbeitens mit ihr die Cholinkinetik in einem ganz anderen Lichte erscheinen ließen.

Ich hatte zu den ersten Versuchen einen möglichst frischen Darm zu erhalten versucht, da ich annahm, daß er bei seinem hohen Cholingehalt schon auf die kleinsten zugegebenen Cholindosen reagieren müsse, während ein zu stark ausgewaschener Darm zur Reaktionsfähigkeit erst eine Auffüllung seines Cholindepots auf die physiologische Höhe und damit größerer und variabler Cholinmengen zur Auslösung einer Reaktion bedürfe als ein frisch resecierter, kräftig

arbeitender, cholinreicher Darm. Aber bei längerem Arbeiten mit der Guggenheimschen Methode machte ich dieselben Beobachtungen wie Storm van Leeuwen und Abderhalden und Paffrath. Ersterer fand, daß eine häufigere Auswaschung des Darmes dessen Empfindlichkeit für Pilokarpin erhöht; letztere schreiben: „Oft muß man, wenn man ein neues Präparat suspendiert hat, warten, bis die Empfindlichkeit des Darmstückes konstant geworden ist."

Besonders das Verhalten des Darmes beim Wechsel der Nährlösung veranlaßte mich zu einer Korrektur meiner Anschauungen über die Cholinwirkung.

Jendrassik und Moser bemerkten bei Versuchen am Kaninchendarm, daß auf Zugabe von Muskelextrakt eine Hemmung sich zeigt, während beim Wechsel der Tyrodelösung eine plötzliche Kontraktur auftritt.

O. B. Meyer fand bei seinen Versuchen mit Kokain-Adrenalin an überlebenden Blutgefäßen, daß bei einem Wechsel der Suspensionsflüssigkeit eine erneute Kontraktion des Arterienrohres eintritt.

Neukirch macht mit Pilokarpin am überlebenden Dünndarm ähnliche Beobachtungen und weist auf eine in der Arbeit von Dale angegebene Kurve hin, die am überlebenden Uterus Histaminwirkung als Ausspülungskontraktur zeigt, ohne aber von Dale beachtet zu werden.

Unbeeinflußt von den Anschauungen obiger Autoren, deren Arbeiten mir erst später zugänglich wurden, veranlaßten mich die Beobachtungen, die ich wiederholt beim Wechsel der Nährlösung machen konnte, an eine Cholinwirkung im Sinne des Straubschen Potentialgefälles zu glauben.

W. Straub wies 1919 durch seine Versuche an Froschherzen nach, daß z. B. für Veratrin und andere Substanzen „Maximum der Giftwirkung und Maximum des Giftinhaltes im Erfolgsorgan zeitlich und ursächlich zusammenfallen, während beim Muskarin ein Wirkungsmaximum bei einem Minimum von Gift im Erfolgsorgan möglich ist". Daß ferner „nicht der Zustand des Bespültseins der Muskelzellen" — bei den Froschherzversuchen — „von der Muskarinlösung, sondern der Vorgang des Eindringens in das Zellinnere das wirkungsbedingende Moment ist".

Das wirkungsbedingende Moment, das Eindringen der wirkenden Substanz ist nicht allein abhängig von deren Konzentration in der Nährlösung, sondern vielmehr vom „Konzentrationspotential", also dem Verhältnis zwischen der Giftkonzentration der Suspensionsflüssigkeit und der des Erfolgsorganes. Bei Annahme einer derartigen Kinetik muß nach Straub der Vorgang der Giftwirkung reversibel sein,

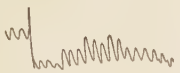
also als wirkungsbedingendes Moment auch der Austritt des Giftes aus den Zellen des Erfolgsorganes nachgewiesen werden.

W. Straub hielt eine ähnliche Wirkung im Sinne des Konzentrationspotentials für wahrscheinlich bei: Pilokarpin, Physostigmin, Nikotin und Adrenalin. Auf Grund nachfolgender Ausführungen glaube ich auch das Cholin dieser Gruppe zuzählen zu dürfen; denn

1. ist ein Wirkungsmaximum bei einem Minimum von Gift im Erfolgsorgan möglich (Beobachtung von der Steigerung der Cholinempfindlichkeit durch Entcholinisierung des Darmes),
2. ist der wirkungsbedingende Vorgang reversibel (Beobachtung des Austritts des Cholins als wirkungsbedingendes Moment).

Die Kurve 8 zeigt das Verhalten des Darmes beim Wechseln der Suspensionsflüssigkeit nach auf Cholinzusatz erfolgter Reaktion. Im Beginn der Kurve (links) ist noch ein Stück der peristaltischen Amplituden nach Abklingen der Cholinreaktion zu sehen. Der bogenförmige, vertikale Strich ist durch das Zusammensinken des Darmes während des Absaugens der alten Nährlösung verursacht. Sobald nun eine frische, cholinfreie Nährlösung zugegeben wird und das Kymographion wieder läuft, zeigt die Darmperistaltik deutlich eine Zunahme der Pendelbewegungen und eine Tonussteigerung, die allmählich bis zu gleichmäßiger, normaler Peristaltik abklingt. Es zeigte sich, daß diese Wasser-Wechsel-Tonusschwankung größer war, wenn im Vorversuch eine größere Menge Acetylcholin zugesetzt worden war oder es sich um einen der ersten Wasserwechsel, die an diesem Darmstück vorgenommen wurden, handelte, und daß sie kleiner wurden, wenn eine geringere Cholindosis im Vorversuch zugesetzt worden war oder der Wasserwechsel zu einer Zeit erfolgte, wo der Darm durch längere Suspension oder durch häufigeren Wasserwechsel ohne erneuten Cholinzusatz entcholinisiert worden war.

Kurve 8.



Diese Wasserwechseltonusschwankung blieb aus, wenn der Cholingehalt des Darmes durch Atropinzugabe unwirksam gemacht worden war. Atropin läßt sich nur schwer auswaschen.

Ferner konnte ich beobachten, daß ein Darm, der bei den ersten Versuchen, kurz nach seiner Resektion, erst auf eine Zugabe von 0,75 ccm Acetylcholin $1 : 10^6$ auf 75 ccm Nährlösung mit einer typischen Reaktion geantwortet hatte, nach öfterem Wechsel der

Nährlösung, oder nach längerer Suspension mit darauffolgendem Nährflüssigkeitswechsel schon auf Dosen von 0,5, später auf 0,2 und endlich sogar auf 0,075, also bei einer Acetylcholinkonzentration von 1 : 1 000 000 000 reagierte, wie durch Kurven belegt werden kann.

Ebenso, wie es gelingt, den physiologischen Cholingehalt des Darmes durch Wechseln der Nährlösung allmählich auszuwaschen, ist es auch möglich, eine durch Zugabe einer größeren Cholinmenge erzielte Überdosierung mit der für sie charakteristischen maximalen tetanischen Kontraktur des Darmes durch häufigeres Wechseln der Suspensionsflüssigkeit zu reversieren. Die Wasserwechseltonusschwankungen sind bei diesen Versuchen besonders ausgiebig.

Bei Annahme einer derartigen Wirkungsweise konnte mir naturgemäß ein cholinreicher Darm, wie ich ihn bisher zu den Titrationen zu erhalten versucht hatte, nicht willkommen sein. Es mußte eine große Menge Cholin zugegeben werden, um gegenüber dem hohen Cholinspiegel der anfangs verwendeten, frischen Darmstücke das zur Reaktion notwendige Potentialgefälle zu erzielen. Jeder Wasserwechsel, jede längerdauernde Suspension wusch mir aus dem vorhandenen Cholindepot des Darmes unberechenbare Mengen aus, und bei der nächsten Titration genügte schon eine kleinere Cholindosis, um das wirkungsbedingende Konzentrationsgefälle zu schaffen. Eine absolute Grenzdosis festzustellen, war demnach unmöglich, und auch der relative Limeswert schwankte in derartig weiten Grenzen, daß die erzielten Cholinwerte keinen Anspruch auf einige Genauigkeit machen konnten.

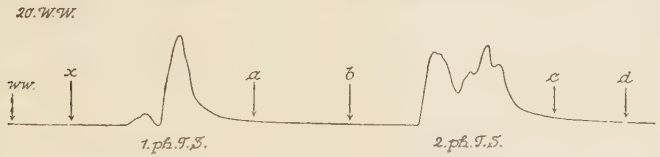
Bei den späteren Versuchen war es mir demgemäß darum zu tun, einen reaktionsfähigen Darm zu erhalten, dessen Cholingehalt möglichst gleich Null war, weil dann bereits eine minimale Menge zugesetzten Cholins das wirkungsbedingende Konzentrationsgefälle zu schaffen imstande war.

Ich habe mich deshalb bei den Serumtitrationen nur noch solcher Darmstücke bedient, die entweder einen im nachfolgenden beschriebenen Tätigkeitsmodus zeigten, oder durch zahlreiche Wasserwechsel oder langdauernde Suspension in Nährlösung mit einigen Wasserwechseln derartig entcholinisiert waren, daß sie auf minimale Cholindosen mit nahezu absoluter Konstanz reagierten.

Hatte ich das Cholin der Darmwand durch häufigen Wechsel der Suspensionsflüssigkeit ausgespült, so trat wiederholt, zugleich mit dem Konstantwerden der Grenzdosis, eine eigenartige Kontraktionsfolge des betreffenden Darmstückes auf der registrierenden Kurve hervor, die den Vorteil hatte, daß bei einem derartig arbeitenden Darmstück eine Unterscheidung zwischen Tonusschwankung und Reaktion gut möglich war (vgl. dagegen Kurve 5—6).

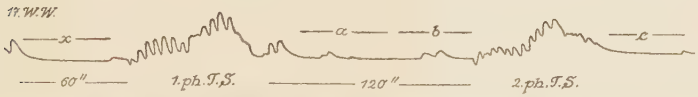
Der Wechsel der Suspensionsflüssigkeit (W.W.) löst die schon oben beschriebene Wasserwechseltonusschwankung aus (auf Kurve 27 noch eben sichtbar), es folgt eine gewisse Zeit der Ruhe, bis dann ohne äußeren Reiz die erste „physiologische" Tonusschwankung (1. ph. T.S.) einsetzt, an welche sich, abermals nach einer Zeit der Ruhe, die zweite physiologische Tonusschwankung (2. ph. T. S.) anreiht, die wiederum nach einer Ruhepause von einer dritten physiologischen Tonusschwankung (nur auf Kurve 26 nach c beginnend registriert) gefolgt ist. Nach Ablauf dieses Zyklus geht die Darmtätigkeit meist

Kurve 25. W.W. = Wasserwechsel



Katzendarm. 20 W.W. x, a, b, c, d Orte bester und sicherster Erregbarkeit.

Kurve 27.

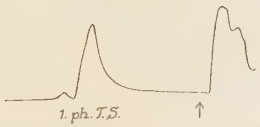


Katzendarm. Beim 16. W.W. Beginn der rhythmischen Tonusschwankungen. 17. W.W.

in eine arhythmische Form über — vielleicht infolge der inzwischen erfolgten Cholinanreicherung der Suspensionsflüssigkeit bis zur Ausgleichung des Konzentrationspotentials. Dieser periodische Zyklus scheint bei vorsichtigem Wasserwechsel sehr konstant zu sein, zeitlich allerdings konnte ich keine Regelmäßigkeit der Ruhepausen feststellen.

Setzt man bei einem auf diese Weise arbeitenden Darmstück während der Ruhepausen, also bei x, a oder b, c oder d Cholin zu, so kann man sicher sein, daß eine eintretende Reaktion durch den

Kurve 29.



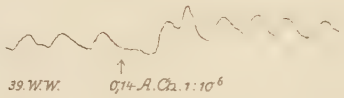
Gleicher Darm wie bei Kurve 25. 25. W.W. Bei a Zusatz von 0,1 A. Ch. $1 : 10^6$.

Zusatz bedingt ist, ohne eine Verwechslung wie bei den Kurven 5—6 befürchten zu müssen.

Auch direkt im Anschluß an eine eben abgelaufene physiologische Tonusschwankung kann eine Zugabe von Cholin- oder Serumlösung erfolgen. Die abklingende Tonusschwankung zeigt dann bei eintretender Reaktion einen erneuten Anstieg.

Bei manchen Darmstücken ist mir allerdings eine Erreichung eines derartigen Aktionsmodus nicht gelungen. Ich habe dann eben unter vorsichtiger, zeitweiliger Kontrolle der jeweiligen Cholinempfindlichkeit so lange die Suspensionsflüssigkeit gewechselt, bis eine beinahe absolute Konstanz des Cholinschwellenwertes erreicht war. Das Kymographion registrierte dann gewöhnlich eine langsame, zögernde rhythmische Bewegung von geringer Amplitudenhöhe bei Fehlen jeglicher Tonusschwankungen.

Kurve 33.



Katzendarm. 30 Stunden auf Eis aufbewahrt.
39. WW. Auf 0,14 A.CH. deutliche Reaktion. Grenzdosis.

Bei Verwendung von nach Magnus präparierten Längsmuskelstreifen gelang es mir nicht, die oben beschriebene rhythmische Kontraktionsfolge zu erzielen. Ich ließ daher den frisch herauspräparierten Darm sich in Tyrodelösung langsam abkühlen und verwahrte ihn bis zu seiner Verwendung im Eisschrank. Aus dem durch die Kälte maximal kontrahierten Darm ließen sich dann leicht die Längsmuskelpräparate durch vorsichtige Trennung der zarten Mucosa plus Ringmuskelschicht von der derben Längsmuskelschicht plus Serosa mittels zweier feiner Pinzetten herstellen. Diese Präparate ergaben die gleiche Cholinempfindlichkeit wie die ganzen Darmstückchen, die physiologischen Tonusschwankungen fehlten, der Schreibhebel registrierte meist eine langsame, zögernde Peristaltik von geringer Amplitudenhöhe. Bei langsamer Abkühlung, Aufbewahrung bei 0^0 und langsamem Erwärmen auf 37^0 fingen auch noch Längsmuskelstreifen wieder zu arbeiten an, die 36 Stunden im Eisschrank aufbewahrt worden waren.

Zusammenfassung.

Ich habe mich in der vorliegenden Arbeit bemüht, eine möglichst eingehende und kritische Übersicht über die Schwierigkeiten zu geben, die bei einer Verwendung der Darmmethode für quantitative Cholinbestimmungen auftreten können.

Diese Schwierigkeiten bedingen nicht nur zahlreiche Fehlerquellen, die den Wert der Methode für quantitative Reihenuntersuchungen herabsetzen, sondern sie erfordern zur Vermeidung der Fehler auch einen Zeitaufwand, der die Methode für klinische Zwecke wenig geeignet macht.

Gleichzeitig im Laboratorium der I. med. Klinik begonnene Untersuchungen über die Froschherzmethode, die zu einer Modifikation der Reid Hunt-Führer'schen Methode führten, haben ergeben, daß die Froschherzmethode in geeigneter Form der Darmmethode für die verfolgten Zwecke überlegen ist.

Literatur-Nachweis.

Stanek, Vl., Zeitschr. f. phys. Chem. 48/334, 54/354. 73. 76. 80. — Schmitt, W. F., Zeitschr. f. phys. Chem. 53/428. — Schulze, E., Zeitschr. f. phys. Chem. 60/155. — Kiesel, A., Zeitschr. f. phys. Chem. 53/215. — Kutscher u. Rieländer, Monatsschrift f. Gebh. u. Gyn. Bd. 25 Heft 6 S. 819. — Kutscher u. Engeland, Zeitschr. f. phys. Chem. 69/228. — Kutscher u. Ackermann, Zeitschr. f. phys. Chem. 69/265. — Kutscher u. Achelis, Zeitschr. f. phys. Chem. 52/91. — Kutscher u. Lohmann, Zeitschr. f. phys. Chem. 48/442, 49/81. 88, 51/457. — Gulewitsch, W., Zeitschr. f. phys. Chem. 25/513, 20/301, 27/50, 29/28. — Gieße, P., Berichte d. Dtsch. chem. Ges. 18/707. — Dide et Saquepée, Soc. d. neurol. de Paris 18. Avril 1901. — Mott u. Halliburton, Phys. Trans. Ser. Bd. 19; The Lancet Nr. 55; Journ. of the chem. Soc. 80/II, 260; Brit. med. Journ. 29. July 1899. — Donath, J., Zeitschr. f. phys. Chem. 39/526. — Rosenheim, Journ. of Phys. 35/465. — Gumprecht, F., Verhandl. d. 19. Kongr. f. inn. Med. 1900. — Ellinger, Ph., M. M. W. 1914, Bd. 61, S. 2336. — Kaufmann, M., Zeitschr. f. phys. Chem. 66/343, 74/175. — Kaufmann u. Vorländer, Ber. d. Dtsch. chem. Ges. 43/2735. — Reid Hunt, Journ. of pharm. ang. exp. Ther. VII/301; Amer. Journ. Phys. 45/163. 231. — Reid Hunt u. de Taveau, Journ. of Pharm. a. exp. Ther. 1/303; Brit. med. Journ. 1906/1788; Hyg. Labor. Bulet. 73/1. — Guggenheim u. Löffler, Biochem. Zeitschr. 74/208, 72/319. 303, 65/215; Abderh. Handb. d. biol. Arb.-Meth. Bd. I Teil 7. — Le Heux, Pflüg. Arch. 147/171, 173/8, 179/177, 190/280. 301. — Sieburg u. Patzschke, Zeitschr. f. exp. Med. 1923 Bd. 36. — Abderhalden u. Paffrath, Pfl. Arch. 207/228. 241, 210/620; Ferm. Forschg. VIII, 284. 294. 299. — Abderhalden u. Wertheimer, Pfl. Arch. 194/207. 254. — Abderhalden, Pfl. Arch. 195. — Abderhalden u. F. Müller, Zeitschr. f. phys. Chem. 24/253, 65/420, 74/253. — Abderhalden u. Gelhorn, Pfl. Arch. 193/47. — Magnus, R., Pfl. Arch. 102; Chem. Centralbl. 1920 III. — Führer, H., Biochem. Zeitschr. 76/241, 77/408; Abderh. Handb. d. bioch. Arb.-Meth. V, 92. — Barger u. Dale, Journ. of Phys. 41. — Arai, K., Pfl. Arch. 193/359, 195/391. — Kühlewein, M. v., Pfl. Arch. 191/92. — Sawasaki, H., Pfl. Arch. 210/1—3. — Theissier et Therenot, C. R. Soc. biol. 64/475. — Storm van Leeuven, Diss. Utrecht 1919/56. — Storm van Leeuven u. C. V. D. Brocke, Arch. f. exp. Pharm. u. Path. 88/304. — Jendrassik u. Moser, Biochem. Zeitschr. 152/94. — Meyer, O. B., Zeitschr. f. Biologie 50/93. — W. Straub, Pfl. Arch. 119/127. — Neukirch, Arch. f. d. ges. Phys. 147/153, 144/555, 146/371. — O. Girndt, Pfl. Arch. 207/464, 469.

Lebenslauf.

Geboren bin ich, Ernst Roeckl, am 14. Dezember 1900 zu Augsburg als Sohn des Kgl. Bayr. Majors Karl Roeckl und seiner Ehefrau Lina, geb. von Bar.

Nach 3 Jahren Gymnasialstudiums in München und Neuburg a. D. trat ich 1913 ins K. B. Kadettenkorps in München ein, von wo aus ich während des Krieges zum 2. bayr. Ulanen-Regiment versetzt wurde. Nach Kriegsende bestand ich das Abitur des Kriegssonderkurses C in München und studierte in München und Hamburg Medizin.

Das Physikum bestand ich 1923, das Staatsexamen Januar 1926, die Doktorprüfung November 1926 in München. Approbiert wurde ich Januar 1927 in München und habe mich Ende April 1927 in Leuna als prakt. Arzt niedergelassen.